

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

# 博士論文審査報告書

## 論文題目

IER5 は HSF1 の活性化因子であり  
がんの進展に寄与する

IER5 is an upstream activator of HSF1 and  
contributes to cancer progression

申請者

浅野	良則
Yoshinori	ASANO

生命医科学専攻

細胞情報学研究

2017 年 2 月

## 1. 論文内容の要旨

*TP53(Tumor Protein 53)*はヒトの様々ながんにおいて変異が認められているがん抑制遺伝子であり、タンパク質 cellular tumor antigen p53 (以下 p53 と略する)をコードしている。p53 は転写活性化因子であり、DNA ダメージなどに応答し様々な標的遺伝子を転写誘導することによって、細胞周期停止やアポトーシスを引き起こし、がん化を抑制する。つまり、p53 の標的遺伝子の機能を解析することこそが、p53 のがん化制御機構の解明に繋がると考えられる。そこで、大木研究室では p53 による新たながん制御機構を明らかにすることを目的に、235 個の新規 p53 標的遺伝子を同定した。大木らは同定した 235 個の新規 p53 標的遺伝子群の中で *IER5 (Immediate Early Response 5)*遺伝子に着目した。*IER5*は血清や TPA 処理といった増殖促進刺激によって発現誘導される遺伝子として過去に同定されており、ヒトの子宮頸がんにおいて *IER5* の発現上昇が認められていた。これより、*IER5* は p53 の標的遺伝子であるにも関わらず、がんの促進に寄与すると予想された。本論文では *IER5* が真にがんの促進に寄与しているのか、そして真にがんの促進に寄与しているのであれば、どのようなメカニズムによってがんを促進させているのかを明らかにすることを目的に *IER5* の機能解析を行った。

まず、*IER5* ががん促進に寄与しているのかを解析した。*IER5* の発現を抑制すると様々ながん細胞の足場非依存性増殖が抑制された。これより、*IER5* はがんの促進に寄与していると考察した。

次に *IER5* がどのようにがん促進に働いているかを明らかにするため、*IER5* の機能を解析した。*IER5* 発現に起因する遺伝子発現の変化をマイクロアレイ発現解析により網羅的に解析したところ、*IER5* によって複数の *HSP (Heat Shock Protein) family* 遺伝子群が強く誘導された。*HSP family* は転写因子 HSF1 (Heat Shock Factor 1)によって発現が制御されているため、*IER5* による *HSP family* の誘導が HSF1 を介しているのか検討した。*HSF1* の発現を抑制した結果、*IER5* の発現による *HSP family* の誘導が生じなかった。さらに、*IER5* 依存的な HSF1 の活性化 (1. 三量体化 2. 核移行 3. DNA 結合能の増加) を認めた。以上より、*IER5* は HSF1 を活性化し、*HSP family* を誘導することを示した。次に、*IER5* が HSF1 を活性化させるメカニズムを解析した。HSF1 はリン酸化などの翻訳後修飾を受けて活性が制御されている。このリン酸化修飾には活性促進に寄与するものと活性抑制に寄与するものが存在する。HSF1 の翻訳後修飾の変化を調べる目的で質量分析を行った結果、*IER5* は活性抑制に寄与する部位を含む複数の部位において HSF1 を脱リン酸化し、HSF1 を低リン酸化型に変換することを示した。*IER5* は過去に PP2A (Serine/Threonine-Protein Phosphatase 2A)と相互作用していることが報告されていた。そこで、PP2A の発現を抑制したところ、*IER5* 依存的な *HSP family* の誘導が減少した。さらに、共免疫沈降法によって *IER5* は PP2A、HSF1 と結合していることを示した。以上より、*IER5* は PP2A、HSF1 と複合体を形成することによって、HSF1

を低リン酸化型に変換し活性化させていることを明らかにした。

以上の結果より、*IER5* は *p53* の標的遺伝子であるにもかかわらずがん促進に機能していることを示した。がん促進メカニズムとしては、*IER5* が *PP2A*、*HSF1* と複合体を形成することによって、*HSF1* を低リン酸化型に変換し活性化させるという可能性が考えられた。

## 2. 論文審査結果

2017 年 1 月 6 日に行われた公聴会では、論文内容の説明と質疑応答が行われた。その概要を以下に記載する。

- 1) 様々な細胞株における *IER5* 発現量を比較したグラフに関し、自ら解析したものであることを本文中に明記すべきとの指摘があり、最終版に反映させた。
- 2) *IER5* 発現の高い細胞株で増殖アッセイやソフトアガーアッセイを行っているが、*IER5* 発現の低い細胞株で同様の実験を行ったことがあるかとの問いに対し、そのような細胞株を用いて増殖アッセイなどの実験を行ったことがないと回答した。
- 3) *HSF1* の多量体化を解析した実験において、実験系が成立することを検証したのかとの問いに対し、検証をしておらずヒートショックを与えたサンプルをポジコンとするなどの措置が必要であったと回答した。(補足：本実験を行うにあたり参考にした論文ではヒートショックを与えたサンプルで多量体化を解析していたため、そのまま実験系を踏襲した。)
- 4) *IER5* が *HSF1* の核移行を促進するという免疫染色のデータにおいて定量的に結果を示すべきではないかとの指摘に対し、細胞をカウントして割合を算出し最終版で示すこととした。
- 5) ヒートショックまたは *IER5* 発現時の *HSF1* のリン酸化レベルをウエスタンブロッティングで解析した結果において、各レーンでのバンドの比較が困難であるとの指摘に対し、最終版では補足として分子量を記載した full blot の図を載せることとした。
- 6) 内在性 *HSF1* の発現が高い 293T 細胞を用いた場合、*HSF1* は核に局在するのかという問いに対し、293T 細胞では内在性 *HSF1* の局在を解析したことがないと回答した。
- 7) OE33 細胞と 293T 細胞の *IER5* 発現量は同程度であったはずだが、OE33 の内在性 *IER5* はウエスタンブロッティングで検出できているのに対し、293T 細胞の内在性 *IER5* は検出できていないように見えるとの指摘に対し、検出時間が違うためであり 293T 細胞の内在性 *IER5* も検出できると回答した。最終版では検出時間を legend に入れることとした。
- 8) *IER5* 発現量が同程度である 293T 細胞と OE33 細胞を、実験によってどのように考えて使い分けているのかとの問いに対し、OE33 は *IER5* ノックダウン時に足場非依存性増殖が抑制される表現型が認められていたため、*IER5* ノックダウン実験は OE33 細胞を用いた。一方、293T 細胞は *IER5* 過剰発現時の *HSF1* シフトダウンやリン酸化修飾の変化が劇的であったため *IER5* 過剰発現実験は 293T 細胞を用いた、と回答した。
- 9) 野生型 *HSF1* と比較し変異型 *HSF1* 発現時には *HSPA1A* の発現が減少するという結果に関

して減少率の計算が誤っているのではないかとの指摘に対し、計算は誤っておらず計算方法の説明不足のため誤解を与えてしまったと回答した。最終版で記述を追加することとした。

10) *IER5* 発現量の違いによってがん転移への影響は認められるのかとの問いに対し、共同研究者が行った実験として、卵巣がんの腹膜播種転移モデルマウスを用いた時、親株と比較して高転移株では *IER5* 発現量が高いというデータが出ていると回答した。

11) がんの臨床サンプルにおいて p53 の変異の有無と *IER5* 発現量に相関が認められるのか、また p53 の変異の有無と *IER5* 発現量でがん種を分類することが可能なのかという問いに対し、解析したことがないためわからないが、TCGA データベースを活用し解析したいと回答した。本件に関し、最終版で記述を追加することとした。

12) *IER5* が脱リン酸化するとした HSF1 の 5 つの部位に関し、Ser121 と Ser307 をリン酸化するキナーゼは明らかになっている。一方、Ser314, Thr323, Thr367 についてはリン酸化を担うキナーゼが同定されているのか、同定されていないのであればアミノ酸配列からキナーゼを予測することはできるかとの質問があった。これに対し、Ser314, Thr323, Thr367 をリン酸化するキナーゼは同定されていない、文献やモチーフデータベースを検索して、キナーゼを予想したいと回答した。本件に関し、解析結果の記述を最終版で追加することとした。

13) *IER5* が足場非依存性増殖を促進するとあるが、どのようなシグナル経路が動いていると考えられるかとの問いに対し、*IER5* によって誘導された HSP タンパク質がアポトーシス経路を阻害していると考えていると回答した。

以上の研究内容の説明と質疑応答を通して、申請者が研究の意義と目的を理解し、本学問領域の十分な学識を備えていると判断された。公聴会で指摘された箇所について適切に修正がなされていることを確認した。本研究成果は *IER5* ががん促進に機能していること、*IER5* が新規の低リン酸化型活性化 HSF1 の形成を誘導することを見いだした初めての報告であり、主査および副査は博士（理学）の学位論文として相応しいと判断した。

2017 年 2 月

主査 早稲田大学教授 理学博士 東京大学

仙波憲太郎

副査 早稲田大学客員准教授 国立がん研究センター研究所 主任研究員  
博士(理学) 東京大学

大木理恵子

副査 早稲田大学教授 博士(医学) 慶應義塾大学

合田亘人